

EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN MICROGOTAS SOBRE NITROCELULOSA (Dot-ELISA) EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. II. ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO EN CUATRO COMUNIDADES RURALES DE VENEZUELA

ROSA M. DE HUBSCH/*, NORMA CHIECHIE***, GUILLERMO COMACH/*, RAFAEL RANGEL ALDAO* & RENATO D'A. GUSMAO**

Departamento de Parasitología * Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua, Universidad de Carabobo, Venezuela ** Unidad de Investigación de la Dirección de Endemias Rurales, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social/Oficina Panamericana de la Salud, Venezuela *** Laboratorio de Chagas Dirección de Endemias Rurales M. S. A. S., Venezuela

The Dot-Enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) in the diagnosis of Chagas' disease. II. Seroepidemiological study in four rural hamlets of Venezuela – *A survey of human Trypanosoma cruzi infection in four rural communities of two Venezuelan states with different epidemiological Chagas' disease situations was carried out using the Dot-ELISA and conventional serology. In the two hamlets of Zulia state, no seropositives were found in the under-15 age group whereas seropositivity in the over-15 group was 15.6%. In Cojedes state, the two hamlets studied exhibited a seropositivity of 8.9% in the under-15 group and 51.6% in the over-15 group. Upon comparison with conventional methods, Dot-ELISA evidenced high co-positivity, co-negativity and efficiency indexes. In the samples taken from Zulia, the predictive value of the test was 66% and 60% for cytoplasmatic and integral antigens, respectively; with the Cojedes samples, 100% and 95%. The results suggest that Dot-ELISA could be a practical alternative for seroepidemiological Chagas' disease studies in underdeveloped regions.*

Key words: Epidemiology – Dot-ELISA – Chagas' disease

En un programa de control de la Enfermedad de Chagas, la utilización óptima de las medidas a tomar, depende de la información básica sobre la prevalencia y distribución de dicha enfermedad, así como de la evaluación continua de estas medidas, desde el inicio del programa. Para obtener la información sobre la morbilidad de esa enfermedad, es necesario el uso de técnicas serológicas, pues los métodos parasitológicos, en este caso, no tienen la sensibilidad requerida. La inmunoserología es uno de los instrumentos más valiosos con que cuenta el epidemiólogo en el estudio de las enfermedades infecciosas endémicas y/o epidémicas; la alta sensibilidad de estas técnicas, así como la reproductibilidad de sus resultados, permiten una adecuada cuantificación del

problema, a través del establecimiento de las tasas de prevalencia e incidencia.

En el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, las pruebas inmunoserológicas más utilizadas han sido la Reacción de Fijación de Complemento (RFC) descrita por Guerreiro & Machado en 1913, la Hemaglutinación Indirecta (RHI), utilizada por primera vez en el diagnóstico de Chagas por Romaña en 1961, la Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (RII) descrita por Fife & Muschel en 1959, y más recientemente el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (Voller et al., 1975). Los primeros estudios seroepidemiológicos sobre la Enfermedad de Chagas se hicieron con la RFC (Guerrero et al., 1965; Bonet et al., 1968), esta reacción fue luego substituída en este tipo de estudios, por la RHI (Goldsmith et al., 1978; Balderrama et al., 1981) que tiene menor complejidad y mayor rendimiento y la RII que ha sido utilizada posteriormente en estudios seroepidemiológicos a gran escala en Brasil (Camargo et al., 1984). La prueba de ELISA, a pesar de ser una prueba más fácil de estandar-

Subvencionado en parte por: UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICIT), Venezuela.

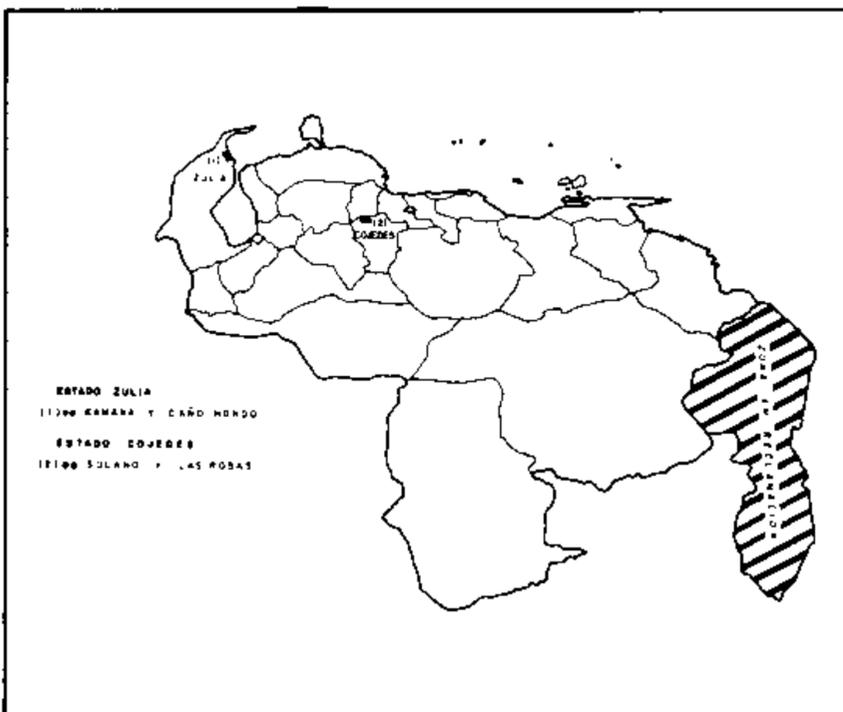
Recibido el 10 de Octubre de 1988.
Aceptado el 17 de Febrero de 1989.

dizar y de ejecutar que las anteriores, ha sido poco empleada en estudios seroepidemiológicos en los países latinoamericanos, probablemente debido al alto costo de las microplacas de polietileno y de los espectrofotómetros de lectura de la reacción.

El Ensayo Inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) tal como ha sido descrito para el diagnóstico de Leishmaniasis por Pappas et al. (1984), es una nueva modalidad de ELISA de menor costo, que en estudios preliminares ha demostrado tener una buena sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (Hubsch et al., 1988). Estas cualidades unidas a su fácil ejecución la convierten en una técnica útil para estudios seroepidemiológicos de la Enfermedad de Chagas. En este sentido, presentamos aquí los resultados de una evaluación serológica de cuatro comunidades rurales epidemiológicamente diferentes, utilizando la técnica Dot-ELISA y las pruebas convencionales de RHI y RII.

MATERIALES Y METODOS

Localidades y población estudiada — Fueron seleccionadas comunidades con conocidos antecedentes epidemiológicos sobre la Enfermedad de Chagas (Fig.); estos antecedentes se obtuvieron en la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (M. S. A. S.), organismo encargado de la campaña antichagásica en Venezuela.



Mapa de Venezuela mostrando las comunidades rurales donde se realizaron las encuestas serológicas para el estudio comparativo Dot-ELISA y las pruebas serológicas convencionales.

Las comunidades de Caño Hondo y Kamana, están ubicadas en el municipio Guajira al norte del estado Zulia, muy cerca una de otra y prácticamente a nivel del mar. El área que las rodea tiene una vegetación xerófila con zonas de bosque de galería en las márgenes de caños y brazos del río Limón. Caño Hondo tiene 17 viviendas de las cuales se encuestaron 14 de ellas (82,3%) y Kamana 50, de las que se examinaron 6 (12%) que estaban muy próximas a Caño Hondo. Las viviendas originales de paredes de barro y techo de palma han sido modificadas a través del tiempo, por lo tanto, de las 20 viviendas seleccionadas 11 (55%) tenían techo de palma y 9 (45%) techo de láminas de metal. Los habitantes de estos caseríos pertenecen a la población indígena Guajira, trabajan en la agricultura y la cría de caprinos y son comunidades sedentarias. Caño Hondo tenía, para el momento del estudio 101 habitantes, mientras que las 6 casas de Kamana albergaban 31 ocupantes. La información epidemiológica obtenida de Malariología indica que en estos caseríos no ha existido infestación de las viviendas por *Rhodnius prolixus*, principal vector de la Enfermedad de Chagas en Venezuela; sin embargo, sí se ha encontrado *Triatoma maculata* en el peridomicilio en 23% de las viviendas.

Las comunidades de Las Rosas y Solano están ubicados en el área montañosa del municipio San Carlos, al norte del estado Cojedes; la primera con una altitud de 350 mts sobre el nivel del mar y la segunda a 400 m. Esta es una zona agrícola donde los principales cultivos son los cereales (maíz), las leguminosas (frijoles negros) y los tubérculos (ñame). La vegetación es de tipo bosque tropical con abundantes palmeras. Las Rosas tiene 31 casas y Solano 49, de las cuales 8 (25,8%) y 15 (30,6%) respectivamente, están construidas con elementos de materia vegetal; las restantes han sido modificadas y tienen paredes frisadas con techos de láminas de metal. Los índices de infestación domiciliar por *R. prolixus* doce años atrás fueron de 90% para Las Rosas y de 100% para Solano; sin embargo, debido a los intensos rociamientos con insecticidas estos índices han descendido, pero manteniéndose un poco por encima de 10%.

Se encuestaron las 23 casas (28,8%) construidas con elementos de material vegetal por tener mayor probabilidad de estar infestadas con triatóminos, y por lo tanto, de haber trans-

misión de la Enfermedad de Chagas (Tonn et al., 1978). Según el censo realizado, la comunidad de Las Rosas tenía 121 habitantes y Solano 225; en las 23 casas seleccionadas había un total de 110 habitantes.

Métodos de estudio en el campo — Después de una visita inicial de información a la población de las referidas comunidades se procedió a realizar un censo de las casas y sus habitantes. Durante dicha visita se citaron las personas a concurrir al dispensario local para la toma de las muestras de sangre. A los menores de 4 años se les tomó la muestra por punción del dedo coleccionándose la sangre sobre papel de filtro Whatman n.º 1 según el procedimiento recomendado por Sousa et al. (1966). Los papeles de filtro con las muestras de sangre desecada, fueron almacenados a 4 °C hasta su envío al laboratorio central. A los mayores de 4 años se les tomó la muestra de sangre por punción venosa procediéndose a la separación del suero en el mismo dispensario de salud; posteriormente los sueros fueron almacenados a 4 °C, por un tiempo no mayor de 24 horas, hasta su entrega al laboratorio central donde fueron conservadas — 20 °C.

Técnicas serológicas — La prueba Dot-ELISA se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Hubsch et al. (1988), utilizando dos preparados antigénicos de formas epimastigotas de *T. cruzi*: el primero un antígeno citoplasmático (Maekelt, 1960) el segundo, formas epimastigotas íntegras previamente formoladas (antígeno integral), se tomaron como títulos diagnósticos: 1:512 para el primer antígeno y 1:128 para el segundo. La Reacción de Hemaglutinación Indirecta (RHI) se efectuó según el procedimiento descrito por Kagan & Norman (1970), usando el mismo antígeno citoplasmático de epimastigotes mencionado antes y a un título diagnóstico de 1:16. La Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (RII) se hizo según la metodología publicada por Camargo (1966), utilizando como antígeno formas epimastigotas previamente formoladas y tomándose como positivos los sueros con títulos superiores a 1:32.

Análisis de los datos — El análisis de los resultados serológicos en muestras no independientes se realizó mediante la comparación de 2 grupos con la elaboración de tablas de 2 x 2 y con la prueba estadística de McNemar (Remington & Schorck, 1970). En las muestras independientes se usó la prueba estadística de "Chi-cuadrado". El nivel de significación estadística

para ambas pruebas fue de $P < 0,05$. El valor predictivo de las pruebas se calculó siguiendo las recomendaciones de Galen y Gambino (1975) y los índices de co-positividad, co-negatividad y eficiencia según Gart & Buck (1966).

RESULTADOS

Los resultados de la serología se presentan en el Tabla I. Los sueros con positividad en una o dos de las reacciones utilizadas, se consideraron dudosos y se incluyeron dentro de los negativos. Como se puede observar, en el grupo de los menores de 14 años, no hubo seropositivos en las localidades del estado Zulia, pero sí en las del estado Cojedes en 8,9%. En el grupo de los mayores de 15 años, hubo seropositivos en los pobladores de las localidades de ambos estados: 15,7% en el estado Zulia y 51,6% en el estado Cojedes, esta diferencia en la seropositividad de las dos comunidades fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

En la Tabla II, se puede observar que con los sueros de los caseríos del estado Cojedes, hubo una mejor concordancia en los resultados de Dot-ELISA y las pruebas serológicas convencionales (RHI, RII) que con los obtenidos en los caseríos del estado Zulia. En las comunidades estudiadas en el estado Cojedes hubo 21 sueros positivos (24,1%) con las pruebas serológicas convencionales y con Dot-ELISA utilizando el antígeno citoplasmático; con Dot-ELISA y antígeno integral se detectaron 22 sueros positivos (25,2%). Los índices de co-positividad, co-negatividad y eficiencias fueron de 1,0 para el antígeno citoplasmático y de 1,0, 0,981 y 0,988 para el antígeno integral respectivamente. Con los sueros de los residentes de los caseríos del estado Zulia las pruebas convencionales detectaron 6 positivos (6,1%); en tanto que Dot-ELISA con antígeno citoplasmático, detectó 9 (9,18%) y con antígeno integral 10 (10,2%). Los índices fueron de: 1,0, 0,968 y 0,969 con el primer antígeno y de 1,0, 0,957 y 0,959 con el segundo.

El valor predictivo positivo de Dot-ELISA con antígeno citoplasmático fue de 66% en el estado Zulia y de 100% en las comunidades del estado Cojedes; para el antígeno integral fue de 60% en las primeras comunidades y de 95% en las segundas.

TABLA I

Seropositividad por grupos de edad, de los habitantes de las comunidades rurales de los estados: Zulia y Cojedes, utilizando las reacciones de: Hemaglutinación Indirecta, Inmunofluorescencia Indirecta y Dot-ELISA con dos preparados antigénicos de *Trypanosoma cruzi*. Venezuela, 1988

Lugares	Grupos de edad	Nº de examinados	Promedio de edad desviación estandar	Seropositividad (*) Nº (%)
<i>Estado Zulia</i>				
Kamana y Caño Hondo	0-14 15 y >	60 38	8 ± 4 38 ± 18	0 6 15.7
Total				
<i>Estado Cojedes</i>				
Las Rosas y Solano	0-14 15 y >	56 31	8 ± 3 36 ± 16	5 16 51.6
Total				

(*) Títulos diagnósticos: RHI, 1:16; RII, 1:32; Dot-ELISA Ag-citoplasmático, 1:512, y Ag-integral 1:128.

TABLA II

Comparación entre los resultados de las pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y Dot-ELISA con dos preparados antigénicos de *Trypanosoma cruzi* mediante el análisis de sueros provenientes de personas de las comunidades rurales de los estados Zulia y Cojedes. Venezuela, 1988

Lugares	Sueros	Pruebas convencionales: RHI, RII		Dot-ELISA antígeno citoplasmático		Dot-ELISA antígeno integral		Indíces de co-positividad co-negatividad y eficiencia Valor predictivo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Estado Zulia</i>									
Kamana y Caño Hondo	Positivos	6**	6.1*	9	9.1*	1.0	10**	10.2*	1.0
	Negativos	92	93.8	89	90.8	0.968 0.969 0.666	88	89.7	0.957 0.959 0.600
<i>Estado Cojedes</i>									
Las Rosas y Solano	Positivos	21	24.1*	21	24.1*	1.0	22	25.2*	1.0
	Negativos	66	75.8	66	75.8	1.0 1.0 1.0	65	74.7	0.981 0.988 0.954

* Diferencias estadísticamente significantes ($p < 0.05$), prueba "Chi-cuadrado".

** Diferencias estadísticamente significantes ($p < 0.05$), prueba McNemar.

Al analizar los resultados con la prueba estadística de "Chi cuadrado", se observó que las diferencias en la positividad, entre las comunidades del estado Zulia y las del estado Cojedes, fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$), con todas las pruebas serológicas. Estu-

diando con la prueba estadística de McNemar para muestras no independientes, las diferencias en la positividad entre Dot-ELISA y las pruebas serológicas convencionales en las muestras de suero tomadas en las dos comunidades del estado Cojedes, se observó que estas no son estadís-

ticamente significativas ($P > 0,05$), lo mismo ocurrió con los resultados de las del estado Zulia, salvo en la diferencia entre Dot-ELISA con antígeno de integral (10 seropositivos) y los ensayos serológicos convencionales, (6 seropositivos) que si fue significativa ($P < 0,05\%$).

En las Tablas III y IV se presentan la distribución de frecuencia de los títulos obtenidos con los sueros positivos en las comunidades estudiadas. Al comparar la media de los títulos no se observa diferencia entre una y otra área, pero si se toma el porcentaje de sueros que dieron títulos igual o mayor que

1:4096, se observa que 95,25% de los sueros positivos de los pobladores de Cojedes presentaron títulos iguales o mayores a 1:4096, con el antígeno citoplasmático y 81,8% con el antígeno integral; en tanto que los sueros procedentes del estado Zulia, con títulos iguales o mayores a 1:4096, fue de 66,7% y 70% respectivamente. Las diferencias encontradas cuando se usó el antígeno citoplasmático fueron significativas ($P < 0,05$), mientras que las diferencias con antígeno integral no fueron estadísticamente significativa. En las Tablas III y IV se puede observar también que la reactividad de las pruebas serológicas convencionales es menor que la de el ensayo de Dot-ELISA.

TABLA III

Distribución de frecuencia de los títulos de los sueros positivos de personas de las comunidades rurales de Las Rosas y Solano del estado Cojedes. Venezuela, 1988

	Nº de sueros	Promedio DE (*) log ₂ de la recíproca de los títulos	Recíproca de los títulos									
			16 (**) 4	32 5	64 6	128 7	256 8	512 9	1024 10	2048 11	4096 12	
RHI	21	5.9 ± 0,89	1	6	8	6						
RII	21	6.7 ± 1,19		5	1	12	1	2				
Dot-ELISA Ag. citopl.	21	11.8 ± 0,65							1			20
Dot-ELISA Ag. integral	22	11.4 ± 1,18							4			18

(*) Desviación estandar.

(**) Log₂ de la recíproca de los títulos.

Títulos diagnósticos: RHI: 1:16, RII: 1:32, Dot-ELISA: Ag. citoplasmático: 1:512, Ag. integral: 1:128

TABLA IV

Distribución de frecuencia de los títulos de los sueros positivos de personas de las comunidades rurales de Kamana y Caño Hondo estado Zulia. Venezuela, 1988

	Nº de sueros	Promedio DE (*) log ₂ de la recíproca de los títulos	Recíproca de los títulos									
			16 (**) 4	32 5	64 6	128 7	256 8	512 9	1024 10	2048 11	4096 12	
RHI	6	6.6 ± 1.21	1	2	1	2						
RII	9	6.1 ± 0.927	3	2	4							
Dot-ELISA Ag. citopl.	9	11.6 ± 0.5									3	6
Dot-ELISA Ag. integral	10	11.6 ± 0.699								1	2	7

(*) Desviación estandar.

(**) Log₂ de la recíproca de los títulos.

Títulos diagnósticos: RHI: 1:16, RII: 1:32, Dot-ELISA: Ag. citoplasmático: 1:512, Ag. integral: 1:128.

DISCUSION

Al comparar los resultados de la prueba Dot-ELISA, con los resultados de la serología convencional se observa que los índices de co-positividad, co-negatividad y eficiencia son bastante altos, indicando que la eficacia de esta prueba es similar a las técnicas de Hemaglutinación e Inmunofluorescencia. Sin embargo, al examinar separadamente los resultados obtenidos en las comunidades del estado Zulia (Tabla II), es evidente la discordancia entre la serología convencional y la prueba Dot-ELISA, debido a la mayor positividad obtenida con esta última. Este hecho podría explicarse por la presencia de reactividad cruzada de los preparados antigénicos usados con anticuerpos contra otro tipo de infección. Alternativamente podría indicar que el nivel de sensibilidad de esta prueba es superior al de las otras, al detectar concentraciones mucho menores de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Esta segunda posibilidad cobra interés al considerar que el área estudiada no es endémica para la enfermedad de Chagas pues *R. prolixus* principal vector en Venezuela no está presente, y por tanto, la transmisión de la enfermedad estaría limitada a los ciclos peridomésticos o silvestre con vectores como *T. maculata*, cuya domiciliación no ha ocurrido todavía en Venezuela. Ante esta situación, podría esperarse que algunos habitantes de esta zona, tengan infecciones crónicas contraídas en otros lugares mucho tiempo atrás, lo cual determinaría niveles muy bajos de anticuerpos al no estar sujetos a reinfección. Lo contrario ocurre con los habitantes de las comunidades del estado Cojedes donde las posibilidades de transmisión son mayores pues existe el vector y posiblemente del parásito, tal como lo demuestra la presencia de seropositivos en los menores de 14 años (Tabla I) y la distribución de los títulos de los sueros positivos (Tabla III y IV), donde se puede observar que la mayoría de los sueros del estado Cojedes presentaron títulos más altos que los del estado Zulia.

Sin restar importancia a las consideraciones de orden biológico, la mayor positividad obtenida con Dot-ELISA en el estado Zulia también podría ser explicada por la presencia de falsos positivos y esto puede inferirse estadísticamente en función del valor predictivo de las pruebas. En las comunidades del estado Cojedes la prevalencia de la enfermedad fue de (24,1%) en tanto que en los caseríos del estado Zulia fue de (6,12%) y por consiguiente el valor pre-

dictivo positivo de las pruebas en el estado Zulia, es de 66% para Dot-ELISA con Ag. citoplasmático y 60% para Dot-ELISA con Ag. Integral, mientras que en el estado Cojedes es de 100% para la primera y 95% para la segunda respectivamente, lo cual determina que las probabilidades de detección de falsos positivos en el estado Zulia son mayores que en el estado Cojedes.

Al estudiar dos zonas con marcadas diferencias geográficas y climatológicas, se demostró que las pruebas serológicas utilizadas (RHI, RII y Dot-ELISA) pueden contribuir al análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en una región determinada, pues la seropositividad obtenida indica el grado de endemidad de la enfermedad. En este caso, la endemidad fue mayor en los lugares estudiados del estado Cojedes, lo cual coincide con los datos entomológicos obtenidos por los servicios regionales de Malariología y con el número de pacientes chagásicos estudiados por los servicios de salud, así como con trabajos previos realizados (Tonn et al., 1978).

Los resultados obtenidos han demostrado también que la prueba Dot-ELISA con los dos preparados antigénicos de *Trypanosoma cruzi*, puede ser utilizada en estudios seroepidemiológicos de la enfermedad de Chagas, pues tiene las condiciones de sensibilidad y especificidad requeridas, fácil ejecución y puede realizarse con gotas de sangre sobre papel de filtro lo que simplifica los trabajos de campo. Sin embargo es preferible utilizar el antígeno integral por su menor costo y por que en la evaluación ya reportada por Hubsch et al. (1988) la prueba Dot-ELISA con este antígeno presentó mejor especificidad que con el antígeno citoplasmático.

RESUMEN

El ensayo inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. II. Estudio seroepidemiológico en cuatro comunidades rurales de Venezuela — Se realizó estudio seroepidemiológico sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* en habitantes de cuatro comunidades rurales de Venezuela, que presentan diferentes situaciones epidemiológicas en relación a la Enfermedad de Chagas, con la finalidad de evaluar la técnica de Dot-ELISA y compararla con las pruebas serológicas convencionales. En los caseríos de Kamana y Caño Hondo del estado Zulia, donde no existe transmisión, la

seropositividad fue 15,7% en adultos solamente. En las comunidades de Las Rosas y Solano del estado Cojedes, área de alta endemicidad, la seropositividad en los menores de 14 años fue 8,9% y en los mayores de 15, 51,6%. En el estudio comparativo con las pruebas serológicas convencionales, Dot-ELISA presentó altos índices de co-positividad, co-negatividad y eficiencia. El valor predictivo positivo de la prueba fue de 66% y 60% con el antígeno citoplasmático e integral respectivamente, en el estado Zulia y 100% y 95% en el estado Cojedes. Estos resultados sugieren que Dot-ELISA puede ser una alternativa práctica para estudios seroepidemiológicos sobre la infección por *Trypanosoma cruzi* en los países en desarrollo.

Palabras claves: Epidemiología – Dot-ELISA – Infección por *Trypanosoma cruzi*

AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Alba Bravo de Mejías de el Laboratorio de Inmunodiagnóstico de la asignatura de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua y a las licenciadas Meudy Medina y Elena Vaccari del Laboratorio de Diagnóstico de Chagas, Dirección de Malariología, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (M. S. A. S.), su valiosa colaboración técnica. Al Dr. Hernando Rubiano, al inspector Crisanto Leal y demás personal de la Zona XV (estado Zulia); al Dr. Pedro Flores y al personal de la Zona XXII (estado Cojedes) de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental por su apoyo en los trabajos de campo. Al Dr. Alirio Torres de la Cátedra de Medicina Tropical de la Universidad del Zulia por su colaboración en el desarrollo de trabajo con la comunidad y al Sr. Miguel Suárez por la revisión del manuscrito.

REFERÊNCIAS

- BALDERRAMA, F.; ROMERO, A.; GARCÍA, J. A.; BERMUDEZ, H.; SERRANO, R.; LA FUENTE, C. & ROMERO, R., 1981. Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en el Trópic. Dpto. de Santa Cruz – Bolivia. Bol. Inf. *CENETROP*, 7: 16-22.
- BONET, A. H.; CICHERO, J. A. & SEGURA, E. L., 1968. Estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas Mazza en comunidades rurales de la provincia de Córdoba: encuesta serológica y electrocardiográfica. *Semana Médica*, 133: 581.
- CAMARGO, M. E., 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 227-234.
- CAMARGO, M. E.; SILVA, G. R.; CASTILLO, E. A. & SILVEIRA, A. C., 1984. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 26: 192-204.
- FIFE, E. H. & MUSCHEL, L. H., 1959. Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Sol. Exper. Biol. Med.*, 101: 540-543.
- GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R., 1975. *Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis*. p. 1-237. In: J. Wiley & Sons (Ed.), New York.
- GART, J. J. & BUCK, A. A., 1966. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83: 593-602.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A., 1913. Da Reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.*, 27: 225-226.
- GUERRERO, L.; DOMÍNGUEZ, Q. M.; GARCÍA, M. G. & BORGES, L., 1965. La campaña contra la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Trop. y Parasitol. Med.*, 5: 219-265.
- GOLDSMITH, R. S.; KAGAN, I. G.; ZARATE CASTAÑEDA, R.; REYES GONZÁLEZ, M. A. & CEDENO, F. J., 1978. Epidemiologic studies of Chagas disease in Oaxaca, Mexico. *Bull. Pan. Am. Health. Organ.*, 12: 236-250.
- HUBSCH, R.; CHIECHI, N.; COMACH, G.; RANGEL, R. & GUZMÁN, R., 1988. El ensayo Inmunoenzimático en microgotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA) en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. I. Estudio comparativo de dos preparaciones antigénicas de *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83: 277-285.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L., 1970. Serodiagnosis of Parasitic Diseases, p. 453-486. In: J. E. Blair, E. H. Lennebe & J. P. Traunt (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. Bethesda, Med. Academic Press.
- MAEKELT, G. A., 1960. Die komplement bindungsreaktion der Chagas krankheit. *Tropenmed. U. Parasitol.*, 11: 152-168.
- PAPPAS, M. G.; HAJKOSKI, R. & HOCHMEYER, W. T., 1984. Standardization for the Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 1105-1111.
- REMYINGTON, R. D. & SCHORCK, M. A., 1970. Section 9-4, p. 242-245. In: R. D. Remington & M. A. Schorck (Ed.). *Statistics with applications to the biological and health sciences*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- ROMAÑA, C., 1961. Aplicación del método de Hemaglutinación al diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 37: 73-76.
- SOUSA, S. L. & CAMARGO, M. E., 1966. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for american Trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 8: 255-258.
- TONN, R. J.; HUBSCH, R.; SUKERMAN, E.; TORREALBA, J. W. & CARRASQUERO, B., 1978. Estudio epidemiológico sobre la Enfermedad de Chagas en ocho centros poblados del estado Coje-

des, Venezuela. *Bol. Inf. Dir. Malariol. y San. Amb.*, 18: 3-15.

VOLLER, A.; DRAPER, C.; BIDWELL, D. E. &

BARTLETT, A., 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *The Lancet*, 1: 426-428.